鹅观草属三个种的染色体组分析与同工酶分析

卢宝荣 颜 济 杨俊良(四川农业大学小麦研究所、灌县)

摘要 本文通过对鹅观草属的 三 个 种: 鹅 观 草(Roegneria kamoji Ohwi)、纤 毛 鹅 观 草 (R. ciliaris (Trin.) Nevski) 和竖立鹅观草 (R. japonensis (Honda) Keng) 的染色 体 组 分析和二种同工酶电泳酶谱的分析,研究了这三个种的系统关系。 两个种均含有两个相同的染色体组。 R. kamoji 和 R. ciliari、 R. japonensis 的杂种 F_1 减 数 分 裂 均 不 正 常,不能结实,而 R. ciliaris 和 R. japonensis的正反交杂种 F_1 减数分 裂规则,结实正常,两个种之间无生殖隔离。 R. kamoji的酯酶和酸性磷酸酯酶同工酶谱与 R. ciliaris 和 R. japonensis 有明显区别,而后二种的上述酶谱无明显差异。上述结果均一致地支持了将 R. ciliaris 和 R. japonensis 合并为一种的 观点,将 R. japonensis 处理为 R. ciliaris 的变种。

关键词 小麦族, 鹅观草属, 鹅观草, 纤毛鹅观草, 竖立鹅观草, 染色体组分析, 同工酶分析

賴观草($Roegneria\ kamoji\ Ohwi$)、纤毛賴观草($R.\ ciliaris\ (Trin.)\ Nevski$)和竖立賴观草($R.\ japonensis\ (Honda)\ Keng)由于其广泛的地理分布而在形态上有较大的变异,特别是后二种的种内变异较大而种间差异极小,其分种界限仅为颖毛的有无和穗子的直立与否。但在颖具纤毛和无纤毛的极端性状之间又存在一些中间类型,而穗子的直立与否由穗的结实性和成熟度决定,并无种的差异,这就造成了对该二种的划分困难。卢宝荣等对<math>R.\ ciliaris\ nR.\ japonensis$ 的细胞学研究资料表明,该二种的核型一致,无种的差异[1]。

松村和阪本[2]曾对R. kamoji和R. ciliaris进行过细胞遗传研究,证明二者含有两个共同的染色体组,Dcwey[3]也支持了这一结论。但他们从未对该二种植物进行过确切的分类鉴定。对于 R. ciliaris 和 R. japonensis这两个种的亲缘关系,还未见有类似的研究报道。为了进一步探讨该三个物种的亲缘关系,以便确定其系统学地位,本文对该三种植物进行了染色体组分析以及分子水平的标记——同工酶电泳酶谱的分析研究。

材料和方法

供试材料系采自各地并引种栽培于四川农业大学小麦研究所的28个居群。

对三个种的各亲本人工去雄、授粉,进行种间相互杂交。统计杂交结实率,收获杂种干燥保存。播期将杂种在培养皿内于25°C的恒温下发芽,统计杂种发芽率,并播种于盆

内。杂种孕穗期取处于减数分裂盛期的幼穗固定,以石碳酸品红染色压片,观察并统计杂种 F_1 花粉母细胞(PMC)减数分裂MI染色体配对行为。对各杂种 F_1 的花粉粒I-KI溶液处理并检查花粉粒的活力,统计自交及自然状况下的结实率。

本文选用的同工酶标记为酯酶和酸性磷酸酯酶。将三个种28个居群的蜡熟种子去释后,用蒸馏水在室温条件下浸泡48小时,使胚和胚乳充分吸胀,然后按样品:蒸馏水1:5 (g/ml) 的比例,在冰浴中匀浆、静置、提取上清液,加入等体积40%的蔗糖溶液,摇匀后以备点样。

采用聚丙烯酰胺凝胶垂直板电泳技术,电泳过程参照文献[4],及 Jaaska 所介绍的方法[5]。凝胶缓冲系统为Tris-HCl缓冲液,pH8.9,分离胶浓度为7.5%,浓缩胶浓度为4%,电极缓冲系统为pH8.3。电泳胶 板 染 色[6,7]后,在30°C下恒温烘干,制成干板[8]用于分析。

结果与分析

1.染色体组分析

亲本传粉习性及细胞学 三个种均为自花授粉植物,其自交结实率很高(表 1)。各 亲本的PMC在减数分裂 MI,染色体均能正常配对(图 1,表 3)

种间杂交结果 三个种各居群的正反交都得到了杂种(表 2)。 $R.\ kamoji(\cappa)$ × $R.\ ciliaris(\cappa)$ 和 $R.\ kamoji(\cappa)$ × $R.\ japonensis(\cappa)$ 的杂交结 实 率 很 低,分别为 3.7%和1.0%, $R.\ ciliaris(\cappa)$ × $R.\ japonensis(\cappa)$ 的结实率为41.0%, $R.\ japonensis(\cappa)$ 的结实率为39.8%,均较高, $R.\ ciliaris(\cappa)$ × $R.\ kamoji(\cappa)$ 的 $R.\ japonensis(\cappa)$ × $R.\ japonensis(\cappa)$ × × × × × ×

表1 三个种各居群的套袋结实率
Table 1 Bagged seed set of different populations in 3 species

种 名 Species	观察小花数 No. of bagged florets	结 实 数 No. of seeds obtained	结 实 率 Ratio of seed set
R. Kamoji	544	491	0.91
R. ciliaris	510	409	0.92
R. japonensis	532	478	0.89

表3 亲本及种间杂种减数分裂MI构型 Table 3 Chromosome pairing at MI of PMCs in the 3 parent species and their F₁ hybrids

亲本及杂种厅1		观察栋数	观察多	观察细胞数		*	色体 构 构 Chromosome figuration	figuration	#H		每细胞平均交叉数
Strains	2n	No. of florets	No. o	No. of cells	-		=		•		Chiasmata/cell
		observed	observed	rved	-	Total	Rings	Rods*	-	И	
R. kamoji	42	က	100	¥*	0.28	20.86	20.40	0.46	1	-	41.24
				×	0 - 2	20-21	19-21	0 - 2			39-42
R. ciliaris	28	က	100	A	0.12	13.94	13.20	0.74	1		27.11
				R	0 — 4	12 - 14	10-14	0 — 3			25-28
R. japonensis	28	က	100	¥		14.00	13.14	0.86	1		27.14
				×		14	11-14	0 — 3			25-28
R. kamoji×R. ciliaris	35	2	20	A	6.25	13.69	12.51	1.81	0.61	0.18	29.54
				ĸ	4 - 8	10-14	9 —14	0 — 3	0 - 2	0 - 1	25-30
R. ciliaris×R. kamoji	35	15	260	A	6.02	13.18	12.00	1.39	0.63	0.29	28.42
				24	3 - 8	9 —16	8 —16	0 5	0-2	0 1	25-29
R. japonensis × R. kamoji	35	13	236	A	6.09	13.39	11.84	1.56	0.48	0.33	28.18
				R	4 9	8 —14	5 —14	2-0	0-2	0 2	25-29
R. ciliaris × R. japonensis	28	17	713	A	0.005	13.95	12.76	1.12	1	0.12	27.72
				×	0 - 2	11-14	10-14	4-0		0-2	25-28
R. japonensis × R. ciliaris	28	29	822	¥	0.009	13.77	10.74	1.05	0.05	0.10	27.41
				R	0-2	12-14	10 - 14	0 - 4	0-2	0-2	25-28

R, 变化范围, Range, Total 二价体总数, Rings 环状二价体数; Rods 棒状二价体数; **A, 平均数, Average,

表2种间杂交结果

Table 2 Results of interspecific crosses within different populations

杂交组合 Combinations			结 Seed	实 set	杂种发芽率 Ratio of germed seeds		
(우× \$)	crosses	florets	No.	%	(%)		
R. kamoji × R. ciliaris (10 populations)	32	563	21	0.37	.100		
R. kamoji × R. japonensis (2 populations)	5	98	1	0.10	0		
$R.$ ciliaris $\times R.$ kamoji (9 populations)	21	378	88	23.2	. 81		
R. ciliaris × R. japonensis (10 populations)	34	588	241	41.0	78		
R. japonensis × R. kamoji (9 populations)	31	568	133	24.3	47		
R. japonensis × R. ciliaris (10 populations)	44	773	308	39.8	79		

表4 杂种 F1 花粉 粒活性及结实率

Table 4 Pollen fertility and seed set in F1 hybrids

杂 种 F ₁	观察花粉数 No. of pollens	可染色花粉 Stained pollens		观察小花数 No. of florets observed		自交结实数 Bagged seed set		自然结实数 Seed set of openning	
F ₁ hybrids	observed	No.	%	В	0*	No.	%	No.	%
R. kamoji $ imes R$. ciliaris	100	0	0	100	100	0	0	0	0
R. ciliaris $ imes R.$ kamoji	550	8	1.00	100	100	0	0	0	0
R. japonensis $ imes R$. kamoji	550	12	2.00	100	100	0	0	0	0
$R.$ ciliaris $\times R.$ japonensis	800	708	88.50	540	540	476	88.15	48.8	90.37
R. japonensis $ imes R$. ciliaris	900	764	84.89	570	520	485	85.09	45.6	87.69

* B. 套袋, O. 自然状况。B. bagging, O. openning.

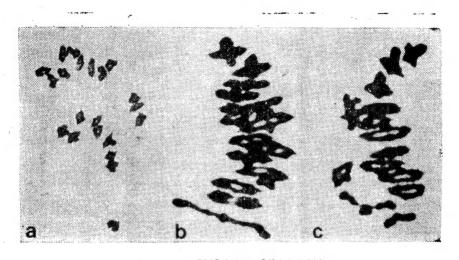
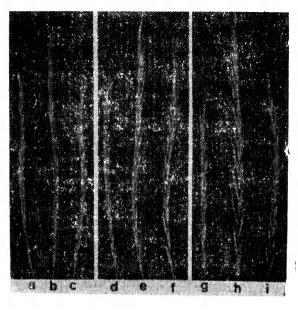


图 1 各亲本PMC减数分裂MI染色体图象 Fig 1 Chromosome pairing of three different parents at MI in PMC meiosis a. R. kamoji, b. R. ciliaris, c. R. japonensis

杂种 F_1 的细胞学分析 杂种 F_1 的 PMC 减数分裂图象及染色体 行 为 见 图 3 - 4 和 表 3 。

Fig. 2 Spikes of different parents and the F_1 hybrids

a, f. R. kamoji, c, g. R. ciliaris, d, i. R. japonensis, b. The hybrid of R. kamoji × R. ciliaris, e. The hybrid of R. japonensis × R. kamoji, h. The hybrid of R. ciliaris × R. kamoji



 $R.\ kamoji \times R.\ ciliaris \times R.\ ciliaris \times R.\ kamoji 和 R.\ japonensis \times R.\ kamoji 杂种 F. 染色体数目均为35,上述三种组合的各杂种 F. 减数分裂构型基本一致。 <math>R.\ kamoji \times R.\ ciliaris$ 的杂种 F. 减数分裂MI形成6.25个单价体, 13.69个二价体和少数多价体,每细胞的平均交叉数为29.25, $R.\ ciliaris \times R.\ kamoji$ 的杂种 F. 减数分裂MI形成6.02个单价体, 13.18个二价体和少数 多价体,每细胞的平均交叉数为28.42, $R.\ japonensis \times R.\ kamoji$ 的杂种 F. 减数分裂MI形成6.09个单价体, 13.39个二价体和少数多价体,每细胞的平均交叉数为28.18。 期望配对模式均为 7 I + 14 I 。 各杂种 F. 减数分裂 A I 和 A I 均出现数目不等的落后染色体和形成染色体标,四分体中形成大量的小核(图 3)。

 $R.\ ciliaris \times R.\ japonensis$ 和 $R.\ japonensis \times P.\ ciliaris$. 杂种 F_1 染色体数目均为28,这两种组合的各杂种 F_1 减数分裂构型基本一致。前者减数分裂MI形成0.005个单价体,13.95个二价体和少数多价体,每细胞的平均交叉数为27.72。后者减数分裂MI 形成0.009个单价体,13.77个二价体和少数多价体,每细胞的平均交叉数为27.41。期望配对模式为14 I 。各 F_1 在减数分裂 A I 染色体都能均等地分向两极(图 4),四分体中未见小核或染色体片段。

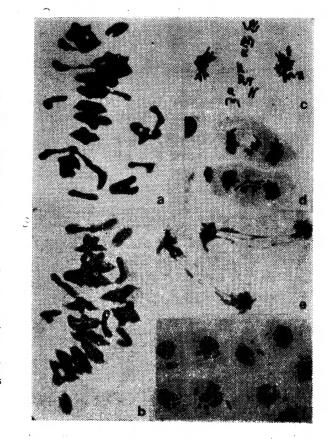
杂种 F_1 花粉活力及结实性 R. $kamoji \times R$. $ciliaris \times R$. kamoji和 R. $kamoji \times R$. japonensis各个组合的杂种 F_1 花粉粒均无活力,并且也不能 正 常 结实;而 R. ciliaris 和 R. japonensis 正反交各个组合的 F_1 花粉粒均正常能育,并有很高的结实率,平均在85%以上(表 4)。这表明 R. ciliaris 和 R. japonensis 这两个种之间完全不存在生殖隔离。

图 3 纤毛鶇观草×鶇观草和竖立鹩观草 ×鶇观草杂种F₁的减数分裂图象

a. 纤毛鹅观草×鹅观草杂种 F_1 的 MI, 13 I + 1 I + 6 I; b. 竖立鹅观草×鹅观草杂种 F_1 的 MI, 14 I + 7 I; c — d. 纤毛鹅观草×鹅观草杂种 F_1 的 A I 和 A I,示落后染色体; e — f. 竖立鹅观草×鹅观草 F_1 的 A I 和 B 和 B 和 B 和 B 不染色体桥和四分体中的小核。

Fig. 3 Meiosis of F_1 hybrids between R. ciliaris $\times R$. kamoji and R. japonensis $\times R$. kamoji

a. MI of F₁ hybrid of R. ciliaris × R. kamoji, 13 I + 1 I + 6 I; b. MI of F₁ hybrid of R. japonensis × R. kamoji, 14 I + 7 I; c - d. A I and A I of F₁ hybrid of R. ciliaris × R. kamoji, laggard chromosomes; c - f. A I and tetrads of F₁ hybrid of R. japonensis × R. kamoji, chromosome bridges and micronuclei.



2.同工酶电泳分析

酯酶同工酶 酯酶的电泳结果见图5a及模式图(图6a)。在三个种的28个居群中酯酶表现出四个主要带区:极慢带区、慢带区、中速带区和快带区,一共出现21条酶带。按酶带迁移率的大小,将各条酶带分别标记编号如下: Es-1,Es-2 ······Es-21。酯酶同工酶在该三个种的不同居群之间,有明显的变异。但是,R. kamoji 具有 Es-1和 Es-2 这两条特殊的酶带,而另两个种则不存在这两条酶带,Es-19、-20 和 Es-21这三条酶带则是R. kamoji所没有的。这就使得R. kamoji 在酯酶酶谱上与另二种有区别。而 R. ciliaris 和 R. japonensis 虽然在酶带上有变异,但其酶谱类型较为一致,很难从酶谱上区分二者。

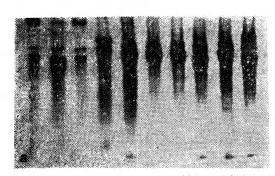
酸性磷酸酯酶同工酶 酸性磷酸酯酶的电泳结果见图5b及模式图(图6b)。在三个种的28个居群中酸性磷酸酯酶表现出二个主要带区:慢带区和中速带区。一共出现了9条酶带,按迁移率的大小将各条酶带分别标记编号为:Apes-1、Apes-2······Apes-9。酸性磷酸酯酶在各个种内均表现相当稳定,种内的不同居群酶带差异极小。在R. ciliaris和R. japonensis中,仅Apes-1、-2和 Apes-3 在少数居群中有微小变异,其余各条酶带均十分稳定。R. kamoji 具有与R. ciliaris和 R. japonensis显著不同的酶谐,Apes-7, -8和Apes-9是前一个种独具的酶带,而Apes-6则是后二个种的特殊酶带。

通过酶谱分析,很易将R。kamoji与另二个种区分开,而R。ciliaris和R。japonensis的酶谱则非常一致,不能以酶谱来区分二者。



图 4 纤毛糖观草和竖立糖观草正反交杂种F1的减数分裂图象

- a, c. 纤毛鹅观草×竖立鹅观草杂种 F_1 的MI, a. $14 \ II$, c. $13 \ II$ + $2 \ II$; b, d. 竖立鹅观草×纤毛鹅观草杂种 F_1 的MI, b. $14 \ II$, d. $12 \ II$ + $1 \ IV$; e, f. 纤毛鹅观草和竖立鹅观草正交及反交杂种 F_1 的AI, 示染色体正常分离。
- Fig. 4 Meiosis of reciprocal F₁ hybrids between R. ciliaris and R. japonensis
- a, c. MI of F_1 hybrid of R. ciliaris $\times R$. japonensis, a. 14 \mathbb{I} , c 13 \mathbb{I} + 2 \mathbb{I} ;
- b, d. MI of F₁ hybrid of R. japonensis × R. ciliaris, b. 14 I, d. 12 I + 1 I,
- e, f. Al of F_1 hybrids of R. ciliaris $\times R$. japonensis and the reciprocal cross, regular chromosome separation.



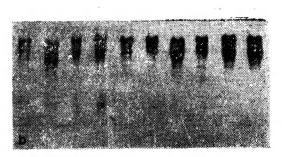


图 5 三个种的酯酶和酸性磷酸酯酶电泳图

Fig. 5 Electropherogram of esterase and acid-phosphatase in the three species

图 6 三个种的酯酶和酸性磷酸酯酶酶谐模式图 a. 酯酶: 1-3.熱观草; 4-7.纤毛熱观草; 8-10.竖立熱观草。

b. 酸性磷酸酯酶: 1-4. 鹅观草; 5-7. 纤毛 触观草; 8-10. 竖立魏观草。

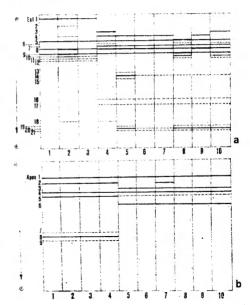
"--"代表强酶带, "……"代表弱酶带。

Fig. 6 Zymogram patterns of esterase and acid-phosphatase in the three species

a. esterase, 1-3. R. kamoji, 4-7. R. ciliaris, 8-10. R. japonensis

b. acid-phosphatase, 1-4. R. kamoji, 5-7. R. ciliaris, 8-10. R. japonensis.

"---" Active bands, "....."Minor bands



讨 论

种间杂种在减数分裂期间染色体配对的规律性,反映了物种之间染色体的 同 源 程度,这种染色体组分析法 (Genome analysis method) 能在染色体全长水平上,以全部核物质为单位来衡量植物的亲缘关系 [9]。杂种中来自不同亲本的染色体组之间的配对交叉数越高,则染色体的同源程度越高,反映了亲本种间的亲缘关系越近,反之,杂种在减数分裂时染色体配对数少或不配对,则反映了亲本种之间的亲缘关系较远或无亲缘关系。因此,种间杂种F₁在减数分裂期间二价体和多价体形成的数目是衡量物种之间亲缘关系的基础。

在R· kamoji 与 R· ciliaris、R· japonensis各个杂交组合的 F_1 减数分裂中,染色体配对数均符合于配对模式 T I +14 II,表明这三个种均含有二个相同的染色体组,R· kamoji多一组独特的染色体。这与松村、阪本 [2] 对 R· kamoji 染色体组 的 标记 (IIKKLL) 和对R· ciliaris 的标记 (IIKK),以及 Dewey 等 [3] 的标记 (R· kamoji SSHHYY,R· ciliaris SSYY)结果是一致的。R· ciliaris 和 R· japonensis正反交的各个杂种 F_1 都得到非常近似的减数分裂构型。二价体的变化范围小,平均为12—14,单价体的数目少于0.01,符合于配对模式14 II。表明 R· ciliaris 所含的两个染色体组和R· japonensis所含的染色体组是同源的。按松村或 Dewey 对 R· ciliaris 的标记,R· japonensis 的染色体组应标记为 IIKK 或 SSYY。该二种植物的染色体组同源,能相互繁育,完全不存在生殖隔离,应属于同一个生物学种。这充分地支持了笔者对这三种植物核型分析所得出的结论。

酯酶和酸性磷酸酯酶同工酶的电泳分析结果,也与上述实验所得结果非常吻合。 R. kamo ji 的两种同工酶均具有与R. ciliaris 和 R. ja ponensis 显著不同的电泳酶谱, 存在着种的差异。而后二种的同工酶谱则表现基本一致,并无种的界限。同工酶是基因的直接产物,较为直接地反映了植物间某些基因的异同,将同工酶标记作为分子水平的指标来追溯植物种间的历史渊源和亲缘关系有其特殊的意义[10]。虽然这些基因不可能完全代表植物的种性,但它无疑是对其它水平研究结果的有力佐证。

从个体、细胞和分子标记这三个不同的水平对魏观草属三个种的研究,都得出了非常一致的结论。因而笔者认为 R · kamoji 是一个 独立的物种,而 R · ciliaris 和 R · japonensis应合并为一个种。它们之间的差异只是基因组合的差异,是在自然选择作用下适应于不同生态环境的结果。将 R · japonensis处理为 R · ciliaris 的变种较为适宜,重新组合应为:

Roegneria ciliaris (Trin.) Nevski var. japonensis (Honda) Yen, Yang et Lu comb. nov.

— Agropyron japonicum Honda, Bot. Mag. Tokyo 41:384, 1927; — Agropyron japonense Honda, Bot. Mag. Tokyo 49:698, 1935; — Agropyron ciliare var. Hondai Keng, Contr. Biol. Lab. Sci. Soc. China 10(no. 2):187, 1936; — Agropyron ciliare var. hackelianum (Honda) Ohwi, f. japonense (Honda) Ohwi, Acta phytotax, & Geobot. 10 (no. 2):9, 1941; Roegneria hackeliana (Honda) Nakai, Bull. Nat. Sci. Mus. Tokyo 31:141, 1952; — Roegneria japonensis (Honda) Keng, Clav. Gen. & Sp. Gram. Sin. (中国主要禾本科植物属种检索表) 71, 186, 1957; Fl. Illustr. Plant. Prim. Sin. Gram. (中国主要禾本科植物图说, 禾本科) 389, f. 317, 1959; Acta of Nanjing Univ. (南京大学学报) 1:10, 63, 1963; — Agropyron ciliare var. minus (Miq.) Ohwi, Fl. of Japan 153, 1965; — Elymus ciliaris ssp. japonicus A. Love, Conspectus of the Triticcae 95(H7—8) 459, 513, 1984.

参考文献

- 1 卢宝荣, 颜济, 杨俊良. 云南植物研究 1988; 10(2):139-146
- 2 Sakamoto S, Muramatsu M. Jap J Genet 1966; 41:155-168
- 3 Dewey D R. Gene Manipulation in Plant Improvement. New York, Plenum Publishing Crop, 1984:209

 -279
- 4 北京农业大学科技情报室。同工酶分析在作物遗传育种上的应用资料汇编。北京: 北京农业大学出版 社, 1981:1-24
- 5 Jaaska V. Theor Appl Genet 1980; 56:273-284
- 6 Nakai Y. Japan J Genet 1979; 54(3):175-189
- 7 Efron Y. Genetics 1970; 65:574-583
- 8 潘苏华. 植物生理学通讯 1982; (3):47
- 9 Kimber G. Proc. 6th Intern Wheat Genel. Symp., Kyolo, Japan. 1983:23-28
- 10 Nishikawa N. Proc. 6th Intern. Wheat Genet. Symp, Kyoto, Japan. 1983:59-63

THE STUDIES OF GENOME ANALYSIS AND ISOZYME ELECTROPHORESIS ON THE THREE ROEGNERIA SPECIES

Lu Baorong, Yan Ji, Yang Junliang
(Triticeae Research Institute, Sichuan Agricultural University, Guanxian, Sichuan)

Abstract The biosystematic relationships among Roegneria kamoji Ohwi, R. ciliaris (Trin.) Nevski and R. japonensis (Honda) Keng in the tribe Triticeae Dumortier were studied in the present paper by the methods of genome analysis and electropherogram analysis of two kinds of isozymes. The three species were all self-pollinated plants. The F₁ hybrids of R. kamoji × R. ciliaris, R. kamoji ×R. japonensis and R. ciliaris×R. kamoji showed an irregular chromosome pairing in meiosis and completely no seed set; the chromosome pairing pattern was nearly 7 I + 14 I. The reciprocal F_1 hybrids of R. ciliaris $\times R$. japonensis presented a regular chromosome pairing in meiosis and very high seed set; chromosome pairing pattern was almost 7 I; and no reproductive isolation between the two species was observed. The three species shared two common genomes (II KK or SS YY). The zymograms of esterase and acid-phosphatase isozymes in R. kamoji were obviously different from those in R. ciliaris and R. japonensis; but no distinct difference was found between the latter two species. Large variations in esteras and almost no variation in acid-phosphatase were observed in different populations of the three species respectively. The evidences obtained from the studies supported the authors' veiw that R. kamoji was an independent species, while R. ciliaris and R. japonensis should combined into one species. R. japonensis was treated as a variety under R. ciliaris. The combined name of this variety ic: Roegneria ciliaris (Trin) Nevski var. japonensis (Honda) Yen, Yang et Lu comb. nov.

Key words Triticeae; Roegneria; R. kamoji; R. ciliaris; R. japonensis; Genome analysis; Isozyme electrophoresis